

Boletim de Pesquisa 209 **e Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 340

Dezembro, 2007

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE
***Vigna unguiculata* (FEIJÃO-CAUPI) INFECTADA COM**
Meloidogyne incognita



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 209

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE
Vigna unguiculata (FEIJÃO-CAUPI) INFECTADA COM
*Meloidogyne incognita***

Santana, C. G.
Andrade, R. V.
Saraiva, M. A. P.
Silva, F.R.
Brasileiro, A. C.
Gossi de Sá, M. F.
Mehta, A

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Mariante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

- A 532 Análise da expressão gênica diferencial de *Vigna unguiculata* (Feijão-Caupi) infectada com *Meloidogyne incognita*. / Celso Gomes Santana ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
12 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 209)
1. Controle biológico. 2. Melhoramento vegetal. 3. Expressão gênica. 4. *Vigna unguiculata*. 5. Feijão-Caupi. 6. *Meloidogyne incognita*. 7. Nematóide. I. Dumas, Vinícius Fiuza. II. Série.

632.96 – CDD 21.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE *Vigna unguiculata* (FEIJÃO-CAUPI) INFECTADA COM *Meloidogyne incognita*

Santana, C. G.¹

Andrade, R. V.²

Saraiva, M. A. P.¹

Silva, F.R.¹

Brasileiro, A. C.¹

Gossi de Sá, M. F.¹

Mehta, A.¹

Resumo

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) constitui uma das espécies mais cultivadas no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste onde, além de importante gerador de empregos e renda, constitui um dos principais componentes da dieta alimentar do nordestino. Porém, a produtividade do feijão-caupi é constantemente ameaçada por agentes ambientais e patogênicos, afetando negativamente o seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Dentre as doenças que afetam esta cultura, pode-se destacar a meloidoginose, causada pelo nematóide *Meloidogyne incognita*, que interfere diretamente na qualidade e quantidade dos grãos produzidos. Bibliotecas subtrativas de cDNA de genótipos resistente e suscetível de feijão-caupi infectados com *M. incognita* foram construídas e um total de 205 unigenes foram obtidos. Genes potencialmente envolvidos com a resistência de feijão-caupi ao nematóide foram identificados. Membranas de macroarranjo de DNA foram construídas visando validar a expressão diferencial dos genes de feijão-caupi identificados neste estudo. Para avaliar a qualidade da impressão dos unigenes nas membranas, uma hibridização com sonda específica para o gene da ampicilina, presente no vetor, foi realizada. Os resultados obtidos revelaram o potencial da técnica de macroarranjo para validar a expressão diferencial dos genes identificados.

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

² Universidade de Brasília

Abstract

The cowpea beans (*Vigna unguiculata*) is one of the most cultivated species in Brazil, mainly in the North and Northeast regions. This culture has economic and social importance, since it is a common diet component. However, the productivity of cowpea-beans is threatened by several biotic and abiotic stresses, which affect the vegetative and reproductive development. Among the pathogens that affect this culture is the nematode *Meloidogyne incognita*, which interferes directly in the grain production. Subtractive cDNA libraries were constructed using resistant and susceptible genotypes infected with *M. incognita*. A total of 205 unigenes were obtained and genes potentially involved in resistance were identified. Macroarray membranes were constructed in order to validate the differential expression of the cowpea genes identified in this study. An *Overgo* hybridization was performed by using the ampicilin gene present in the cloning vector as probe. This was performed to observe the quality of the gene spotting process onto the membrane. The results showed the potential of the macroarray technique to validate the differential expression of the identified genes.

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) constitui uma das espécies de grande valor socioeconômico no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste onde, além de importante gerador de empregos e renda, constitui um dos principais componentes da dieta alimentar do nordestino. Porém, a produtividade do feijão-caupi é constantemente ameaçada por agentes ambientais e patogênicos, afetando negativamente o seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Um dos principais problemas desta cultura é a infecção pelo nematóide das galhas. *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* são as principais causadoras de perdas econômicas, que podem chegar a 31% na produção (Charchar et al., 1995). O seu controle é realizado por rotação de culturas e principalmente pelo uso de nematicidas, que oneram significativamente a produção. Além do alto custo, os nematicidas causam graves prejuízos ambientais e sociais, pois apresentam alta toxicidade e seus resíduos, altamente estáveis, contaminam o solo e mananciais hídricos por tempo indeterminado.

Fontes de resistência têm sido encontradas em materiais silvestres, porém sua utilização tem sido dificultada devido à incompatibilidade genética entre espécies e a necessidade de vários retrocruzamentos, que tornam os programas de melhoramento muito longos. Tendo em vista a baixa eficiência dos métodos de controle atuais e as limitações do melhoramento genético convencional, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de cultivares resistentes a fitonematóides através de métodos biotecnológicos modernos. Existem genótipos nematóide-resistentes que, por não apresentarem outras características agronômicas importantes desejáveis, não são cultivados em escala comercial. Estes genótipos se constituem em excelentes fontes de genes de resistência, que podem ser identificados e isolados para serem utilizados como marcadores moleculares em programas de seleção assistida ou serem incorporados diretamente em plantas, via transgenia, oferecendo importantes alternativas para o controle de fitonematóides.

O objetivo deste estudo foi construir bibliotecas subtrativas de cDNA utilizando genótipos resistente e suscetível de *V. unguiculata* na tentativa de identificar genes possivelmente envolvidos com a resistência a *M. incognita*. Para validar a expressão diferencial dos genes de feijão-caupi identificados, membranas de macroarranjo de DNA foram também construídas.

Material e Métodos

1. Cultura de nematóides, extração de ovos e eclosão de juvenis

M. incognita mantidos em tomateiros em casa de vegetação foram utilizados neste estudo. Para a obtenção dos nematóides, o sistema radicular dos tomateiros foi lavado com água corrente e as raízes foram trituradas no liquidificador com solução de 0,5% (v / v) de hipoclorito de sódio. O material resultante foi separado por um conjunto de peneiras de 100 a 400 mesh. Os ovos retidos na segunda peneira foram coletados e depois depositados em papel toalha sobre uma peneira plástica dentro de um recipiente com água destilada. Após a eclosão dos ovos, os juvenis foram coletados por centrifugação a 2500 x g por 30 minutos e contados para a infestação de plantas de feijão.

2. Infestação das plantas e coletas das raízes infectadas

As plantas de feijão dos genótipos CE31 (resistente) e CE109 (suscetível) foram infectadas com aproximadamente 5000 larvas de *M. incognita* após atingir 2 meses de idade. As coletas das raízes infectadas foram realizadas 3, 6 e 10 dias após a infecção. Todas as raízes coletadas receberam o mesmo procedimento de limpeza e conservação – lavagem com água, congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a -80° C.

3. Construção das bibliotecas subtrativas de cDNA, clonagem e sequenciamento

RNA total foi extraído utilizando Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) e a construção das bibliotecas de cDNA foi realizada utilizando o kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech). Foi realizada hibridização de cDNAs de raízes do genótipo resistente CE31 contra cDNAs de raízes do genótipo suscetível CE109 (biblioteca 1) e vice-versa (biblioteca 2), para identificar genes expressos exclusivamente em cada genótipo. Os produtos diferenciais obtidos foram clonados em pGEM T-Easy (Promega) e seqüenciados em Seqüenciador Automático ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems Inc.). As homologias das seqüências foram analisadas utilizando o programa Blast (Altschul et al., 1997).

4. Confecção das membranas de macroarranjo e condições de hibridização

Para a confecção das membranas de macroarranjo, foram utilizados os clones das duas bibliotecas subtrativas de cDNA de feijão-caupi construídas. O DNA plasmidial dos 205 clones representando o conjunto unigene foi extraído.

Após a quantificação e análise da qualidade do DNA plasmidial extraído, estes foram impressos em membranas de náilon utilizando-se um sistema robotizado (Q-BOT-GENETIX-UK), onde cada clone foi depositado 20 vezes em duplicata. Como controle positivo, foi utilizado o gene *cromatina* por apresentar expressão nos dois genótipos. Após a transferência dos DNAs, as membranas foram desnaturadas, neutralizadas e posteriormente fixadas em aparelho CrossLink (CL1000, UVP) e também em forno a 80° C por 2 horas. Estas membranas foram posteriormente submetidas à hibridação *Overgo*, que consiste na marcação com [32P]dCTP do gene *hpt* (ampicilina) presente no vetor pGEM-T-Easy.

Resultados e Discussão

As raízes dos genótipos CE31 e CE109 coletadas nos diferentes tempos foram utilizadas para extração de RNA e foram obtidos aproximadamente 100 ug de cada material. Foi realizada purificação do mRNA utilizando o kit Oligotex (Qiagen) e foram obtidos aproximadamente 0,5 ug de mRNA dos tecidos dos dois genótipos, que foram utilizados para a síntese de cDNA utilizando o kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech). As seqüências de cDNA diferenciais, obtidas após as etapas de PCR primário e PCR secundário foram visualizadas em gel de agarose 1,5%. A maioria dos fragmentos apresentou tamanhos de 0.1 a 1.5 Kb (Figura 1). Estes fragmentos foram clonados em vetor pGem-T-Easy (Promega) e seqüenciados. Foram obtidas 440 seqüências válidas, sendo que o tamanho mínimo de inserto considerado para análise foi de 30 pb (phred > 20). A análise das seqüências revelou 205 *clusters* e as bibliotecas foram finalizadas com porcentagem de novidade de aproximadamente 50%.

A análise das sequencias através do programa Blastx revelou vários genes envolvidos com a resistência a estresses bióticos conhecidos e alguns desses genes foram expressos apenas no genótipo resistente (Tabela 1). Foram identificados genes que codificam para proteínas hipotéticas e proteínas relacionadas com a resposta a ferimentos e resistência ao ataque de insetos e patógenos, incluindo lipoxigenases (Silva, 2001), citochrome P450 (Young-Cheol, 2006), epoxido hidrolase (Guo, 1998), entre outras (Tabela 1). Esses genes devem ser estudados através de técnicas de validação de expressão e função, principalmente aqueles que codificam proteínas de função desconhecida, para determinar o seu papel específico durante o processo de resistência da planta à infecção por *M. incognita*.

Para validar a expressão diferencial dos genes identificados, membranas contendo o conjunto unigene de feijão-caupi foram construídas para análises de macroarranjo. O DNA plasmidial extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2). Foi

obtida uma membrana contendo os 205 unigenes de feijão-caupi em duplicata. A hibridação *Overgo* revelou que não houve sobreposição do DNA dos clones e também validou a impressão dos mesmos na membrana (Figura 3).

Uma heterogeneidade na intensidade dos pontos hibridizados foi observada. Essas diferenças na intensidade do sinal de hibridização pode ter ocorrido devido às diferentes concentrações de DNA dos clones utilizados neste estudo (Figura 1). Os pontos de hibridação e os sinais foram quantificados pelo programa *MultiGauge* - Fujifilm através da criação de grides, as quais transformam a intensidade dos sinais em valores números brutos. Estes valores serão utilizados para comparação com os valores obtidos em estudos futuros de hibridização com cDNAs dos genótipos resistente e suscetível infectados com o nematóide. A comparação dos valores permitirá a quantificação da expressão diferencial.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram genes potencialmente envolvidos com a resistência de feijão-caupi a *M. incognita*. Os experimentos de macroarranjo mostraram a viabilidade da utilização desta técnica para validação da expressão diferencial dos genes identificados. Os pontos de hibridização foram claramente definidos e apresentaram intensidade de sinal adequada para a quantificação e normalização. Recentemente, o genoma de *V. unguiculata* foi seqüenciado e uma grande quantidade de informações estará disponível no banco de dados em breve (<http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/>; Chen *et al.*, 2007). Muitos trabalhos de expressão gênica têm sido reportados nesta cultura (Carvalho *et al.*, 2006 ; Carvalho *et al.*, 2006b ; Carvalho *et al.*, 2004). Entretanto a interação feijão-caupi-nematóide tem sido muito pouco estudada e os mecanismos de resistência ainda não são compreendidos. Ensaios de hibridação com as sondas de cDNA estão em andamento e após a validação da expressão dos genes identificados, será possível utilizar os genes para transformação de plantas visando obter genótipos de feijão-caupi resistentes a *M. incognita*.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e FAPDF/CNPq.

Referências Bibliográficas

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Resesarch* v.25, p.3389-3402, 1997.

de Carvalho MH, Pham-Thi AT, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Fodil YZ. Isolation and characterization of an aspartic proteinase gene from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). J Plant Physiol. 2004, 161:971-6.

Carvalho AO, Souza-Filho GA, Ferreira BS, Branco AT, Araújo IS, Fernandes KV, Retamal CA, Gomes VM. Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. Plant Physiol Biochem. 2006, 44:732-42.

Carvalho AO, Filho GA, Ferreira BS, Branco AT, Okorokova-Façanha AL, Gomes VM. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. Protein Pept Lett. 2006, 13:1029-36.

Charchar, J.M.; Horino, Y.; Moita, A.W. Reação de cultivares de feijão-de-vagem em áreas infestadas por *Meloidogyne javanica*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.13, n.1, p.77, 1995.

Chen, X. ; Laudeman, TW ; Rushton, PJ ; Spraggins, TA ; Timko, MP. 2007. CGKB : an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. BMC Bioinformatics, 8 :129.

Silva, M. D. S.; Oliveira, M. G. A.; Lanna, A. C.; Pires, C. V.; Piovesan, N. D.; José, I. C.; Batista, R. B.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. 2001. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *diaphorte phaseolorum f.sp. meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. Revista Brasileira Fisiologia Vegetal. vol.13 no.3.

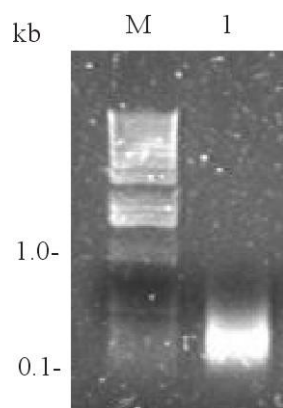
Young-Cheol Kim, Soo-Yong Kim, Kyung-Hee Paek, Doil Choi, Jeong Mee Park. 2006. Expression of cacyp1, a novel cytochrome p450 gene, compromises the basal pathogen defense response of pepper plants. Biochemical and Biophysical Research Communications vol.345 p. 638-645.

Guo, A.; Durner, J.; Klessig, D. F. 1998. Characterization of a tobacco epoxide hydrolase gene induced during the resistance response to tmv. The Plant Journal. vol. 15. p. 647-656.

Tabela 1. Genes possivelmente envolvidos com a resposta de resistência, expressos no genótipo CE31 (Resistente) de *Vigna unguiculata*

| Contig/Read | Proteína codificada | Número de Acesso |
|---------------------|--|------------------|
| Contig 48 | putative Lipoxygenase 2.3, chloroplast precursor | CAD45187.1 |
| Contig 41 | NADP-isocitrate dehydrogenase | gb AAD51361 |
| RFEJ03_F_F10_.b_079 | putative GH1 protein or auxin-regulated protein | gb AAT93852 |
| RFEJ03_F_E12_.b_087 | elongation factor 1A SMV resistance-related protein | gb AAT72900 |
| Contig 4 | Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase | gb AAM61215 |
| RFEJ01_A01_.b_001 | Cysteine protease | BAA96501 |
| RFEJ01_G01_.b_004 | Putative epoxide hydrolase | BAA84626 |
| RFEJ01_A06_.b_037 | NO HITS | |
| RFEJ01_E08_.b_055 | NO HITS | |
| RFEJ01_G01_.b_004 | putative epoxide hydrolase | dbj BAA85201.1 |
| RFEJ02_C02_.b_006 | lipoxygenase 2 | emb CAD45187.1 |
| RFEJ03_E07_.b_051 | putative Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB | dbj BAD15724.1 |
| RFEJ03_F03_.b_027 | unknown | gb AAM65433.1 |
| RFEJ03_F08_.b_063 | NO HITS | |
| RFEJ03_G08_.b_056 | Cytochrome P450 family protein, expressed | gb ABF97993.1 |
| RFEJ04_F03_.g_027 | phosphoenolpyruvate carboxylase | gb AAG00180.1 |

A)



B)

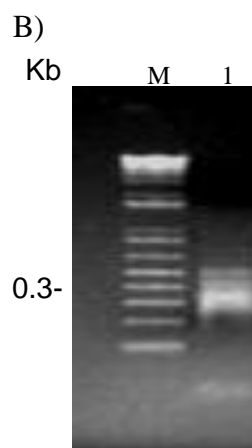


Figura 1. Produtos diferenciais obtidos após o PCR secundário na biblioteca 1 (A) e 2 (B). M, Ladder 1 kb (Invitrogen).

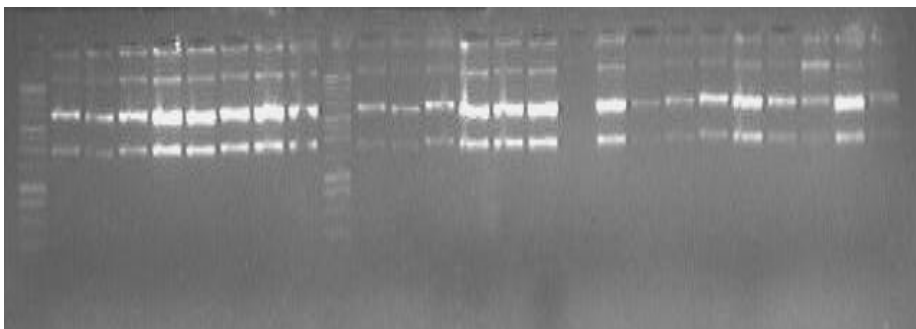


Figura 2. Análise da extração de DNA plasmidial de alguns clones das bibliotecas subtrativas de cDNA de feijão-caupi em gel de agarose 1%.

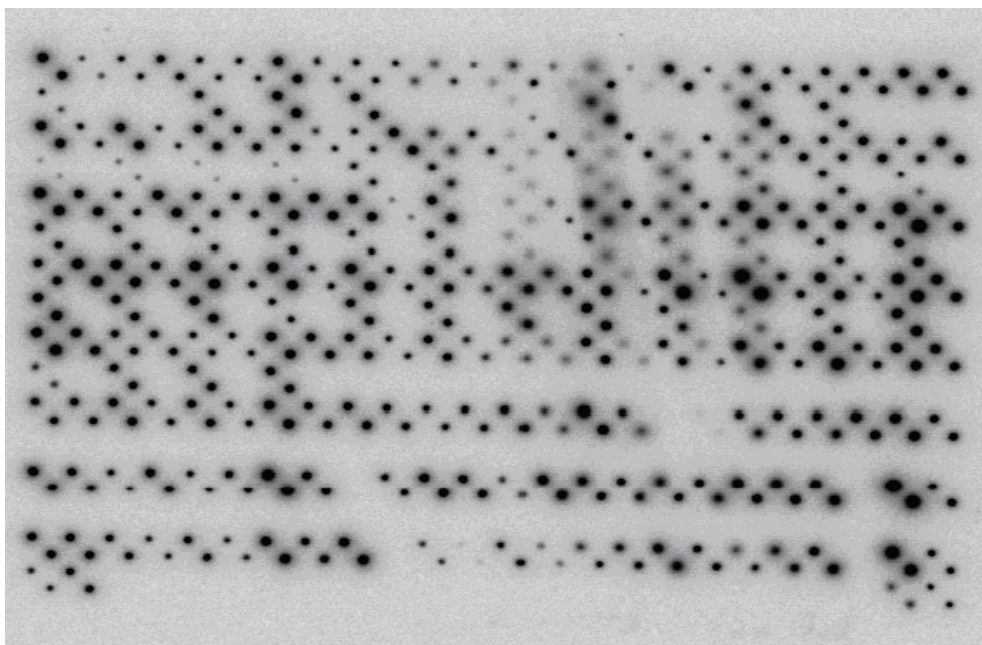


Figura 3. Membrana contendo o conjunto unigene de feijão-caupi após hibridização *Ovego* e exposição de 24h.